

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2002-189014

(43)Date of publication of application : 05.07.2002

(51)Int.Cl.

G01N 27/327
C12M 1/34
C12Q 1/00
G01N 27/416
// C12Q 1/26

(21)Application number : 2000-387275

(71)Applicant : SANKYO CO LTD

(22)Date of filing : 20.12.2000

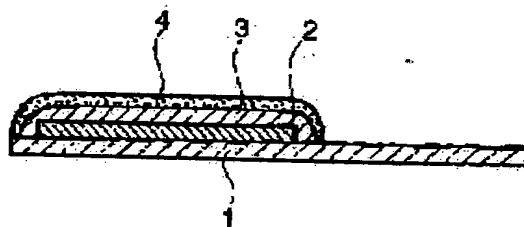
(72)Inventor : YAMAMOTO MASATOSHI
YAZAWA YUKIE
NIWAYAMA HIROSHI

(54) ENZYME ELECTRODE

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide an enzyme electrode, in which corpuscle separatability is improved, the effects of interfering substances in a liquid to be tested are reduced, swelling time of the liquid to be tested to a red corpuscle separating layer and an enzyme layer is shortened, and the effects of the low amount of oxygen in the liquid to be tested are reduced.

SOLUTION: The enzyme electrode is formed, by sequentially laminating the enzyme layer (3) with an enzyme as main component fixed by albumin and a hydrophilic high-molecular substance and the corpuscle separating layer (4), with high-viscous polysaccharide and high viscosity alcohol as the main components on a platinum electrode (2) provided on an insulating substrate (1).



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2002-189014
(P2002-189014A)

(43) 公開日 平成14年7月5日 (2002.7.5)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード* (参考)
G 0 1 N 27/327		C 1 2 M 1/34	E 4 B 0 2 9
C 1 2 M 1/34		C 1 2 Q 1/00	B 4 B 0 6 3
C 1 2 Q 1/00		1/26	
G 0 1 N 27/416		G 0 1 N 27/30	3 5 3 B
// C 1 2 Q 1/26			3 5 3 J
審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 6 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2000-387275 (P2000-387275)

(22) 出願日 平成12年12月20日 (2000. 12. 20)

(71) 出願人 000001856

三共株式会社

東京都中央区日本橋本町3丁目5番1号

(72) 発明者 山本 雅俊

東京都中央区銀座2丁目7番12号 三共株式会社内

(72) 発明者 矢澤 幸江

東京都品川区広町1丁目2番58号 三共株式会社内

(74) 代理人 100105647

弁理士 小栗 昌平 (外4名)

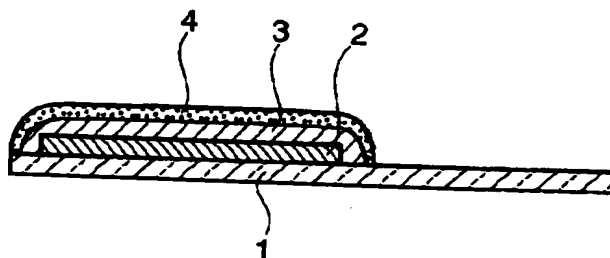
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 酵素電極

(57) 【要約】

【課題】 血球分離能を向上させ、被検液中の妨害物質の影響を軽減させ、被検液の血球分離層及び酵素層への膨潤時間を短縮し、且つ被検液中の低酸素量の影響を低減させた酵素電極を提供する。

【解決手段】 絶縁性基板 (1) 上に設けた白金電極 (2) 上に順次、酵素を主成分としてアルブミンと親水性高分子物質とで固定された酵素層 (3) 及び高粘性多糖類と高粘性糖アルコールとを主成分とする血球分離層 (4) を積層してなる酵素電極。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 絶縁性基板上に設けた白金電極上に順次、酵素を主成分としてアルブミンと親水性高分子物質とで固定された酵素層及び高粘性多糖類と高粘性糖アルコールとを主成分とする血球分離層を積層してなることを特徴とする酵素電極。

【請求項2】 前記酵素が、基質と反応して過酸化水素を産出する酵素であることを特徴とする請求項1記載の酵素電極。

【請求項3】 前記酵素が、グルコースオキシダーゼであることを特徴とする請求項2に記載の酵素電極。

【請求項4】 前記酵素層が、牛血清アルブミンと親水性高分子物質とで酵素を固定してなることを特徴とする請求項1～3の何れか1項に記載の酵素電極。

【請求項5】 前記高粘性多糖類が、アルギン酸ナトリウムであり、かつ前記高粘性糖アルコールがD-マンニトールであることを特徴とする請求項1～4の何れか1項に記載の酵素電極。

【請求項6】 前記酵素層が、酵素濃度を保持しつつ、酵素活性が低下されていることを特徴とする請求項1～5の何れか1項に記載の酵素電極。

【請求項7】 前記血球分離層の上に、一定距離を隔てて親水化処理を施したメッシュ状シートを付設したことを特徴とする請求項1～6の何れか1項に記載の酵素電極。

【請求項8】 絶縁性基板上に設けた白金電極上に順次、グルコースオキシダーゼを主成分として牛血清アルブミンとカルボキシメチルセルロースナトリウムとで固定された酵素層及びアルギン酸ナトリウムとD-マンニトールとを主成分とする血球分離層を積層してなることを特徴とする酵素電極。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

【発明の属する技術分野】本発明は、被検液中の特定物質を検出するための酵素電極に関し、例えば糖尿病患者が在宅で自己の血糖値を測定するために使用される簡易式血糖値測定装置に適した酵素電極に関する。

【0002】

【従来の技術】血液等被検液中のグルコースを分析する手段として、グルコースオキシダーゼと酸化型電子伝達物質とを電極上に担持させた、所謂「酵素電極」が使用されている。これは、被検液中のグルコースとグルコースオキシダーゼとの反応によって酸化型の電子伝達物質が還元され、それにより作用極上で電子を放出し、この放出電子による電流を検出することで、グルコース濃度を定量するものである。

【0003】しかし、上記測定において、血液中の赤血球やヘモグロビン等の物質が電極表面に付着して、測定の妨げとなることが知られている。これら妨害物質の量が多いと、電極上での過酸化水素の酸化あるいは、電子

伝達物質による電子の供受が阻害され、グルコース濃度に依存した本来の信号が得られず、臨床上の診断、管理に大きな問題となる。そこで、例えば特許第2550463号公報では、電極上に親水性高分子膜を付設して血球分離能を付与することを提案している。この血球分離膜により、赤血球を分離し、電極に付着しないようにすることが可能になる。しかし、溶血した赤血球から放出されるヘモグロビン等の微細な妨害物質を完全に除去することはできない。

【0004】また、血球分離層は乾燥状態で電極上に固定されているため、測定に際して被検液による膨潤が必要であり、通常、血液を電極に点着してから測定終了までに30秒から60秒程度要している。本発明の主たる使用目的のように、糖尿病患者が在宅で自己の血糖値を分析する場合、通常被検液となる血液は指先から数μL採血されるため、当然ヘパリンなどの抗凝固剤は使用されない。従って、測定時間が長いと、電極上で血液が凝固し始め、正常な反応が進まない。また、臨床的には、インスリン過剰投与による低血糖昏睡の予知は一刻を争うため、速やかな測定が要求されている。

【0005】更には、例えば酸素吸引している患者は、被検液中の酸素分圧が数百mmHg以上の場合もあり、このような高酸素濃度の被検液を分析する場合、上記反応以外の副反応、即ち酸素と水の存在下でグルコースとグルコースオキシダーゼとの反応が促進されて副産物となる過酸化水素が多量に生成し、本来のグルコース濃度よりも低い測定結果となる。

【0006】また、アスコルビン酸や尿酸等に代表される還元性物質が被検液中に大量に存在していると、作用極上でこれら還元性物質が酸化され、グルコースによる反応以外の電流が付加され、本来のグルコース濃度よりも高い測定結果となる。そこで、特許第2550463号公報では、酵素を固定化した作用極と、固定化しない作用極とを一对形成し、その出力差をとることによって還元性物質の影響を取り除くことを提案している。しかし、この場合、2つの作用極の分析精度が満足されて初めて正確なグルコース濃度が定量できるため、測定装置の要因を増やす方向にあり、必ずしも最適とは言えない。

【0007】また、酵素電極に被検液を導入するための手法として、毛細管現象を利用した特許第2527933号公報、特開平10-318970公報や特公平6-58338号公報等に記載の方法が知られている。毛細管現象は、電極上に形成されたキャピティによって実現されるが、被検液を吸い込ませるための導入口は一個所に限定されるため、特に視力の低下した患者にとって導入口が限定されることは望ましくない。また、誤って導入口以外の部材に被検液が付着した場合、被検液と部材との間に作用する付着力によって、導入口に入らないという問題も発生する。更に、生産性から論ずれば、キャ

ビティを形成させるために要するスペーサ、その上に被せる蓋材などが必要となり、またこれらを電極絶縁部に固定するためには接着剤が必要となり、製造コストの上昇につながる。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】本発明はこのような状況に鑑みてなされたものであり、①血球分離能を向上させ、②被検液中の妨害物質の影響を軽減させ、③被検液の血球分離層及び酵素層への膨潤時間を短縮し、且つ④被検液中の低酸素量の影響を低減させた酵素電極を提供することを目的とする。

【0009】

【課題を解決するための手段】上記目的を達成するために、本発明は、絶縁性基板上に設けた白金電極上に順次、酵素を主成分としてアルブミンと親水性高分子物質とで固定された酵素層及び高粘性多糖類と高粘性糖アルコールとを主成分とする血球分離層を積層してなることを特徴とする酵素電極を提供する。

【0010】また、本発明は、前記酵素が、基質と反応して過酸化水素を産出する酵素であることを特徴とする上記酵素電極を提供する。

【0011】また、本発明は、前記酵素が、グルコースオキシダーゼであることを特徴とする上記酵素電極を提供する。

【0012】また、本発明は、前記酵素層が、牛血清アルブミンと親水性高分子物質とで酵素を固定してなることを特徴とする上記酵素電極を提供する。

【0013】また、本発明は、前記高粘性多糖類が、アルギン酸ナトリウムであり、かつ前記高粘性糖アルコールがD-マンニトールであることを特徴とする上記酵素電極を提供する。

【0014】また、本発明は、前記酵素層が、酵素濃度を保持しつつ、酵素活性が低下されていることを特徴とする上記酵素電極を提供する。

【0015】また、本発明は、前記血球分離層の上に、一定距離を隔てて親水化処理を施したメッシュ状シートを付設したことを特徴とする上記酵素電極を提供する。

【0016】更に、本発明は、絶縁性基板上に設けた白金電極上に順次、グルコースオキシダーゼを主成分として牛血清アルブミンとカルボキシメチルセルロースナトリウムとで固定された酵素層及びアルギン酸ナトリウムとD-マンニトールとを主成分とする血球分離層を積層してなることを特徴とする酵素電極を提供する。

【0017】

【発明の実施の形態】以下、図面を参照して本発明に係る酵素電極の好適な実施の形態について説明する。

【0018】図1に断面図として示すように、本発明に係る酵素電極は、ガラスエポキシ樹脂等の絶縁性基板1上に設けた白金電極2上に順次、酵素を主成分としてアルブミンと親水性高分子物質とで固定された酵素層3及

び高粘性多糖類と高粘性糖アルコールとを主成分とする血球分離層4を積層して構成される。

【0019】酵素層3に含まれる酵素としては、例えば、グルコースオキシダーゼ、コレステロールオキシダーゼ、ウリカーゼ、乳酸オキシダーゼ等を使用することができる。中でも、グルコースオキシダーゼが好ましい。

【0020】また、酵素を固定するための親水性高分子物質としては、例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリソルベート等を使用することができる。中でも、カルボキシメチルセルロースナトリウムが好ましい。

【0021】また、アルブミンとしては、例えば、牛血清アルブミン、牛血清以外の各種動物血清アルブミン、鶏卵製アルブミン等を使用することができ、中でも牛血清アルブミンが好ましい。また、アルブミンと同様の作用を有するカゼイン、ゼラチン、レシチン等の動物由来の血中蛋白質ブロッキング剤を使用することもできる。従って、本発明のアルブミンには、上記の動物由来の血中蛋白質ブロッキング剤も含まれる。

【0022】一方、血球分離層4に含まれる高粘性多糖類としては、例えば、アルギン酸ナトリウム、ペクチン、キトサン塩酸塩等を使用することができる。中でも、アルギン酸ナトリウムが好ましい。

【0023】同じく血球分離層14に含まれる高粘性糖アルコールとしては、例えば、D-マンニトール、D-ガラクトース等を使用することができる。中でも、D-マンニトールが好ましい。

【0024】上記酵素電極によれば、血球分離層4中の高粘性糖アルコールにより、溶血ヘモグロビンを含めた赤血球の凝集能が亢進し、血球分離能を向上させることができる。図2は、高粘性糖アルコールであるD-マンニトールを含有させたことによるヘマトクリットへの影響を示すグラフであるが、D-マンニトールを含有することにより、誤差が大幅に低減することがわかる。

【0025】また、酵素層3をアルブミンで固定させることにより、被検液中の還元性物質の影響を軽減させることができる。即ち、本発明によれば、電極を差動型にせずに、分析精度を向上させることが可能である。これは、白金電極2上に固定させたアルブミンと還元性物質とが反応し合い、還元性物質が作用極上に到達することを妨げるためと推察される。

【0026】更に、酵素層3をアルブミンと親水性高分子物質とで固定させることによって被検液の血球分離層4及びこの酵素層3への膨潤時間を短縮し、化学反応を促進することができる。即ち、アルブミンが果たす役割は、その親水性を利用して血球分離層4の上部に被検液を急速に透過させることにあり、また親水性高分子物質が果たす役割は、その吸水性を利用して前者と同様に被

検液を急速に透過させることにある。従って、この2つの物質の複合により、より短時間に白金電極2の上に被検液の水分(血液で言えば血漿)を透過させることができる。本発明において、測定所要時間は17秒であるが、その中の3~7秒ほどで血球分離層4及び酵素層3を膨潤させることができる。

【0027】被検液中には、アルブミンをはじめ種々の蛋白質が存在する。従って、被検液を血球分離層4に点着させると、アルブミンや他の蛋白質が白金電極2の上に付着して電気化学的反応を阻害することが考えられる。しかし、本発明のように予めアルブミンを固定させることによって、被検液中のアルブミンや他の蛋白質が固着する影響を干渉させることが可能となる。

【0028】上記の各作用を踏まえて本発明に係る酵素電極では、酵素層3の製造に用いる溶液には、酵素(例えばグルコースオキシダーゼ)を16~48mg/mL、アルブミン(例えば牛血清アルブミン)を3~9mg/mL、親水性高分子物質(例えばカルボキシメチルセルロースナトリウム)を3~9mg/mL含有させることが好ましい。また、血球分離層4中に、高粘性多糖類(例えばアルギン酸ナトリウム)を5.25~15.75mg/mL、高粘性糖アルコール(例えばD-マンニトール)を1.8~5.4mg/mL含有させることが好ましい。

【0029】尚、酵素層3及び血球分離層4には、pH調整剤を含有させてもよく、それにより各物質の作用が一層促進されるようになる。pH調整剤としては、例えばリン酸二水素ナトリウム、リン酸水素二カリウム等を挙げることができる。また、このpH調整剤によるpH範囲は、6.0~7.5の範囲とすることが好ましい。

【0030】また、上述のように、被検液中のグルコースは、酸素と水の存在下で酵素層3中の酵素と反応して過酸化水素を生成する。この生成した過酸化水素を電氣的に定量すれば、被検液中のグルコース濃度が求められる。即ち、生成した過酸化水素濃度とグルコース濃度との比例関係は、充分に反応する場合にのみ成立する。言い換えれば、被検液中の酸素が充分でないと、グルコース濃度に比例した過酸化水素が生成されず、この比例関係は成立しない。臨床的には0~600mg/dLのグルコース濃度が測定できれば充分であるが、前記の通り酸素が充分でないと、測定可能な範囲も狭くなる。これを解決する手段として、電極上で被検液中の水分を電気分解することで酸素を生成させることでも可能であるが、本発明では酵素層3中の酵素の活性を予め低下させておくことで、反応に必要な酸素消費量を低減させることが好ましい。

【0031】そのための方法としては、例えば、酵素層3を、30~37℃、75%RH以上の高湿度下に10~20時間程度放置することにより、酵素層3の酵素の濃度を保持しつつ、酵素活性のみを低下させることがで

きる。また、75%RH以上で1時間程度放置後、直ちに乾燥する工程を複数回繰り返してもよい。あるいは、酵素層3に紫外線を10~20時間程度照射しても同様の効果が得られる。以下、このような酵素活性の低下を、酵素活性の最適化と呼ぶ。

【0032】上記の酵素活性の最適化により、被検液中の酸素が充分でない場合でもグルコース濃度と過酸化水素濃度との比例関係を0~600mg/dLの広範囲で維持することが可能となる。図3は、グルコースオキシダーゼを35℃、85%RHの高湿度下で、処理時間を変えて処理した時の活性能力を測定した結果を示すグラフであるが、この条件下では約20時間の処理により活性能力がほぼ一定の値まで低下している。尚、活性能力はルミノール試薬による化学発光定量分析により求めた。

【0033】上記の酵素電極3及び血球分離層4を備える本発明の酵素電極は、例えば以下の方法により作製することができる。即ち、先ず、絶縁性基板1に電極形成部及び周辺回路をパターンニングした後、白金電極2を所定形状に形成し、その上に、上記した成分を含む酵素層用塗布液を塗布し、室温にて乾燥して酵素層3を形成する。次いで、上記した成分を含む血球分離層用塗布液を酵素層3の上に塗布し、室温にて乾燥して血球分離層4を形成する。そして、酵素活性最適化処理(例えば、35℃、85%RH)で10~20時間程度放置した後、室温にて乾燥することにより酵素電極が得られる。

【0034】本発明においては、必要に応じて、図4に示すように、保護膜を兼用し、被検液を効率よく導入するためにメッシュ状シート5を酵素電極の全面を覆うように付設してもよい。このメッシュ状シート5の材料としては、例えばポリエステル、ナイロン、ポリプロピレン等を挙げることができる。また、このメッシュ状シート5に、例えばラウリル酸ナトリウムやコロナ放電等による親水化処理を施すことが好ましく、それにより被検液の血球分離層4への導入がより確実かつ迅速に行われる。

【0035】メッシュ状シート5の固定方法としては、電極両側に直接熱圧着する方法を採ることができる。熱圧着温度は、150~300℃とすればよい。この時、酵素層3の温度に対する安定性が問題となるが、メッシュ状シート5を熱圧着する際に、血球分離層4の上にステンレス板を挟み込み、熱圧着後に抜き取る等して熱圧着用のヒートブロックが直接電極部に作用しないようにし、更にその加熱時間を1~3秒程度とすることにより、酵素層3、特にグルコースオキシダーゼの熱による酵素活性の低下を防ぐことができる。また、メッシュ状シート5を熱圧着で固定する際に、このようにステンレス板を挟み込み、熱圧着後に抜き取る方法を採用することにより、血球分離層4とメッシュ状シート5との間に100~200μmの隙間が確保されるため、血球分離層4

による分離作用が妨げられることもなくなる。

【0036】以上の工程によって作製された電極に対して、メッシュ状シート5の上方から被検液を滴下して直接的に血球分離膜4に導入してもよく、或いはメッシュ状シート5の吸水性を利用して被検液を血球分離膜4に導入してもよい。従って、メッシュ状シート5は、上記の電極部両側での固定の他に、電極部の両側に他の一边を加えた上面形状略コ字状に熱圧着してもよく、あるいは電極部近傍の基板上に突起を設け電極部周囲の4辺全てを熱圧着してもよい。前記突起を設けることにより、血球分離膜4との接触を避けることが可能となる。このように熱圧着でメッシュ状シート5を固定することにより、接着剤による固定や、血球分離膜4との隙間を形成するためのスペーサを用いる必要もなくなり、コストの低減につながる。

【0037】

【実施例】以下、実施例により本発明を更に説明する。但し、本発明は本実施例により何ら制限されるものではない。

【0038】（実施例1）下記に示す、酵素層用塗布液及び血球分離層用塗布液をそれぞれ調製した。

・酵素層用塗布液：1mL当たり、pH6.0～7.5の範囲内の0.05Mリン酸緩衝液（リン酸二水素ナトリウム及びリン酸水素二カリウムを用いて製造）をベースとして、カルボキシメチルセルロースナトリウムを6mg、グルコースオキシダーゼを32mg、牛血清アルブミンを6mg及びラウリル硫酸ナトリウムを0.42mg配合して調製した。

・血球分離層用塗布液：1mL当たり、pH6.0～7.5の範囲内の0.884Mリン酸緩衝液（リン酸二水素ナトリウム及びリン酸水素二カリウムより製す）をベースとして、アルギン酸ナトリウムを10.5mg、D-マンニトールを3.6mg配合して調製した。

【0039】そして、上記各塗布液を用い、下記の手順により酵素電極を作製した。

（a）図1に示すように、ガラスエポキシ基板1の上に白金電極2を設け、その上に前記酵素層用塗布液1μLを塗布した。

（b）室温（25℃）、湿度20%以下の環境下で1時間以上乾燥させて酵素層3を形成した。

（c）酵素層3の上に前記血球分離層用塗布液を1μL塗布した。

（d）室温（25℃）、湿度20%以下の環境下で1時間以上乾燥させて血球分離層4を形成させた。

（e）温度35℃、湿度85%の環境下に16時間曝して酵素活性最適化処理を施した。

（f）室温（25℃）、湿度20%以下の環境下で24時間以上乾燥させた。

【0040】尚、上記において、酵素層用塗布液及び血球分離層用塗布液の塗布は、3次元方向に移動可能なロボットに塗布ノズルとして内径0.31mm、外径0.77mmのテフロン（登録商標）チューブを取付け、ローター式ポンプから塗布液を送出して行った。塗布時の電極面から塗布ノズル先端までの距離は0.35mmとし、塗布ノズルの移動速度は2mm/secとした。塗布ノズル先端の動きは、電極表面を血球分離層用塗布液及び酵素層用塗布液が完全に覆うように電極の形状に合わせて軌跡を描かせた。これらの制御はコンピュータにより行った。

【0041】作製した酵素電極について、標準グルコース溶液を用いて直線性を評価した。結果を図4に示すが、良好な直線性を示すことがわかる。

【0042】

【発明の効果】以上説明したように、本発明に係る酵素電極は、被検液中の妨害物質の影響が少なく、被検液中のグルコース濃度を正確に、かつ迅速に測定できる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明に係る酵素電極の一実施形態を示す断面図である。

【図2】D-マンニトールのヘマトクリットへの影響を示すグラフである。

【図3】グルコースオキシダーゼの活性能力と酵素活性低下処理時間との関係を示すグラフである。

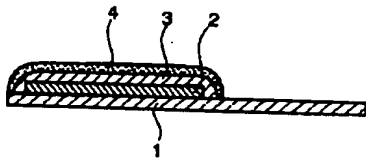
【図4】本発明に係る酵素電極の他の実施形態を示す斜視図である。

【図5】実施例において、グルコース溶液を測定した結果を示すグラフである。

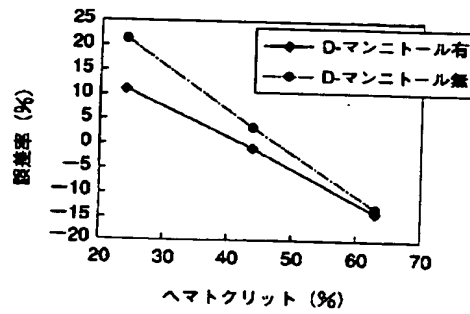
【符号の説明】

- 1 絶縁性基板
- 2 白金電極
- 3 酵素層
- 4 血球分離層
- 5 メッシュ状シート

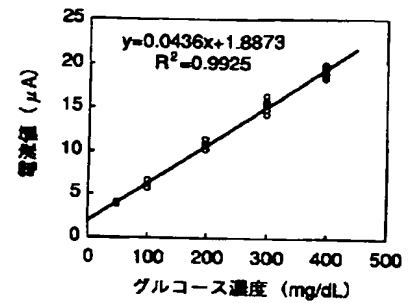
【図1】



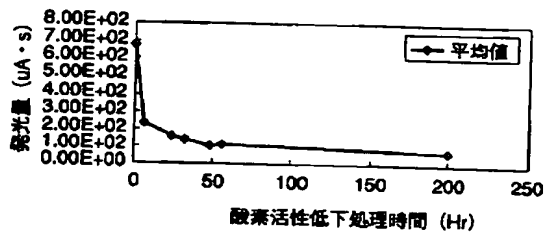
【図2】



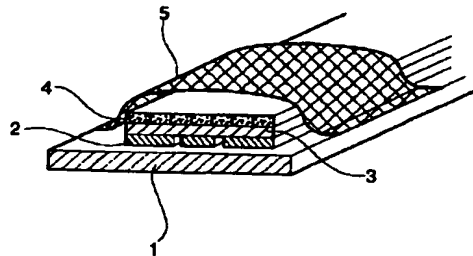
【図5】



【図3】



【図4】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 7

識別記号

F I

G 0 1 N 27/46

テマコード (参考)

3 3 8

(72) 発明者 庭山 妃呂司

東京都品川区広町1丁目2番58号 三共株式会社内

Fターム(参考) 4B029 AA07 BB16 CC03 CC08 FA12
4B063 QA01 QA18 QQ03 QQ23 QR85
QS39 QX05